

遺伝子組換えカイコ発現系を用いて生産した Xeno-Free組換えヒトフィブロネクチンの開発



○ 八桁 清樹、富田 正浩 (株式会社 免疫生物研究所 遺伝子組換えカイコ開発室)

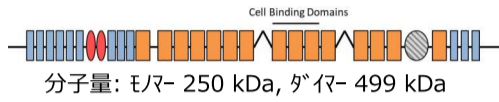
概要

- ・ 血漿由来フィブロネクチンは間葉系幹細胞等の培養足場材として使用されている。しかし、血液が原料となるため病原体の混入リスクが高い
- ・ 本研究では、組換えヒトフィブロネクチンを体内で発現し、繭中に分泌できる遺伝子組換えカイコを作製した
- ・ 繭中に分泌された組換えヒトフィブロネクチンを効率よく抽出するため、尿素および界面活性剤を用いた抽出用バッファーの最適化を行なった
- ・ 動物由来物質を含むゼラチン担体などを使用せず、アガロースベース担体を用いた液体クロマトグラフィーによる精製方法を検討した
- ・ 精製した組換えヒトフィブロネクチンを用いて、インテグリンへの結合能、細胞接着能、エンドトキシンや細菌・微生物の混入について解析した

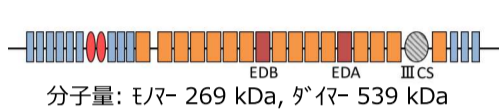
組換えヒトフィブロネクチンを発現する遺伝子組換えカイコの作製

フィブロネクチンアイソフォーム

血漿フィブロネクチン
 ・ 血液凝固や創傷治癒に関与
 ・ EDA (-), EDB (-), III CS (+)

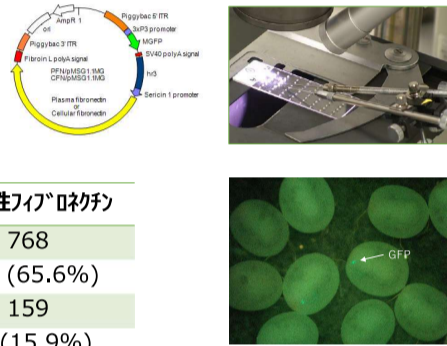


細胞性フィブロネクチン
 ・ 増殖や移動に関与する
 ・ 接着や移動性に優れ、増殖を促進?
 ・ EDA (+), EDB (+), III CS (+)



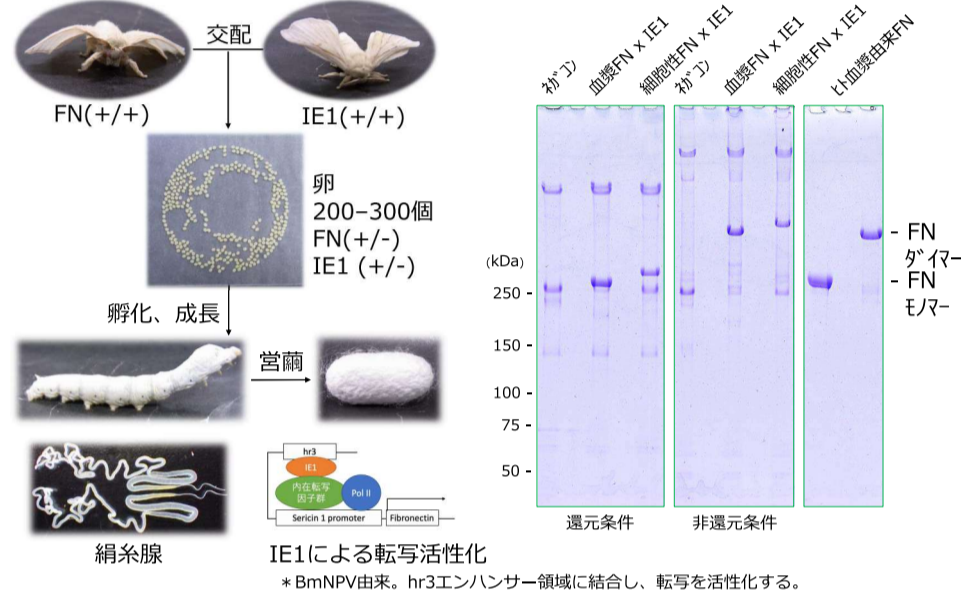
カイコゲノムへのヒトフィブロネクチン発現カセットの挿入

- ・ カイコ卵へのプラスミド(①と②)を注入
 ① ヒトフィブロネクチンとマーカー遺伝子を含む
 ② Piggybacトランスポザナーゼ遺伝子を含む
- ・ 卵内での②のPiggybacトランスポザナーゼが発現し、①の発現カセットがカイコゲノム内に挿入される
- ・ 次世代のカイコ卵でマーカー遺伝子発現カイコを選抜



組換えヒトフィブロネクチンを大量発現するカイコの作製

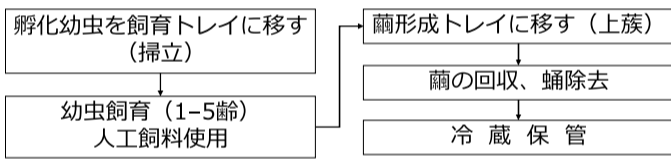
- ・ 血漿または細胞性フィブロネクチン(FN)発現カイコと転写活性化因子発現カイコ(IE1*)を交配
- ・ 繭の抽出液において、SS結合を介したホモダイマーを形成したFNが発現が確認できた



	血漿フィブロネクチン	細胞性フィブロネクチン
インジェクトした卵数	768	768
孵化数 (孵化率)	436 (56.7%)	504 (65.6%)
得られた次世代蛾区数	171	159
陽性蛾区数	39 (22.8%)	25 (15.9%)

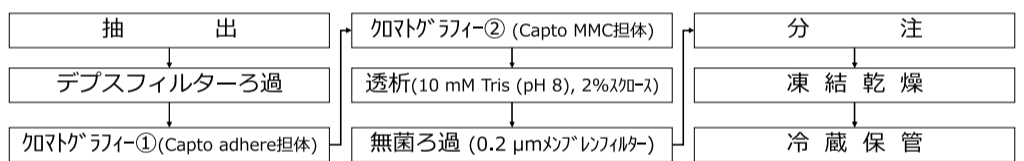
遺伝子組換えカイコを用いた組換えヒトフィブロネクチンの生産

遺伝子組換えカイコの大量飼育による繭生産



	飼育頭数	生産した繭の総量	繭1個あたりの平均重量
血漿フィブロネクチン	18,000	707 g	64.3±3.7 mg
細胞性フィブロネクチン	18,000	640 g	65.3±7.1 mg

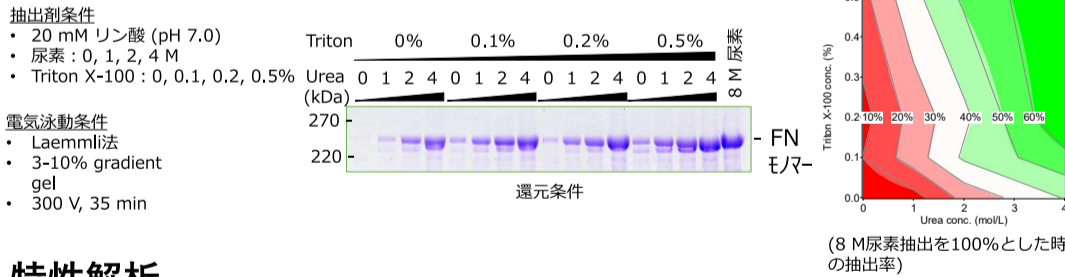
繭からの組換えフィブロネクチンの精製



	繭量	総生産量	精製FN量/繭
血漿フィブロネクチン	15 g	125 mg	535 µg
細胞性フィブロネクチン	20 g	122 mg	398 µg

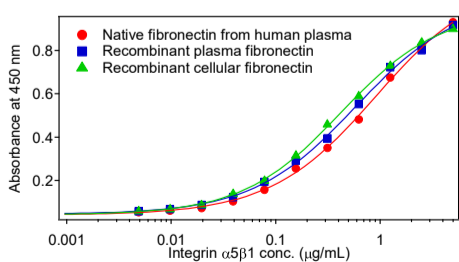
抽出条件の検討

- ・ 繭からの組換えヒトフィブロネクチンの抽出に際し、尿素および界面活性剤(Triton X-100)を使用することで、抽出率が向上した

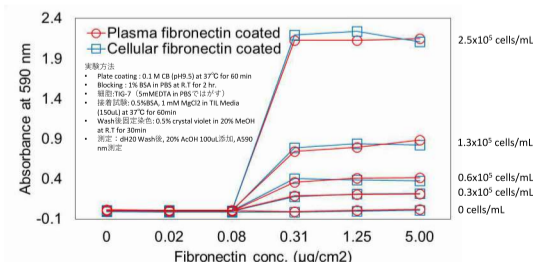


特性解析

固相化FN-インテグリンα5β1結合アッセイ

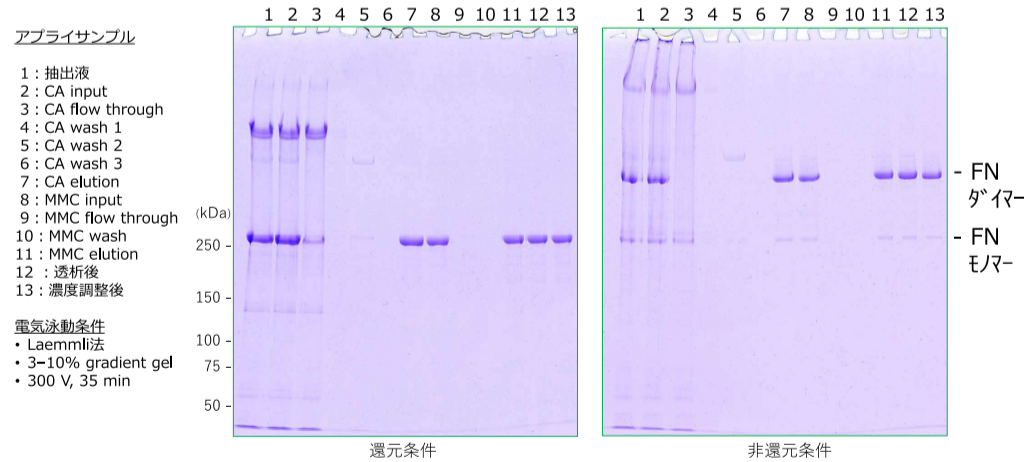


固相化FNに対するTIG-7細胞接着アッセイ



項目	手法	血漿フィブロネクチン	細胞性フィブロネクチン
濃度	吸光度	545.1 µg/mL	479.4 µg/mL
純度	SDS-PAGE	92.9%	88.7%
エンドトキシン	比色法	2 EU/mg以下	2 EU/mg以下
マイコプラズマ	核酸増幅法	陰性	陰性
無菌	直接法	陰性	陰性
カバ	インテグリン結合アッセイ	82.1%	105.7%

血漿フィブロネクチン精製における各プロセス液のSDS-PAGE分析



まとめ

- ・ 血漿または細胞性の組換えヒトフィブロネクチンを繭中に分泌する遺伝子組換えカイコを作製した
- ・ 繭中の組換えヒトフィブロネクチンは、ジスルフィド結合を介したホモダイマーを形成していることが確認できた
- ・ 尿素および界面活性剤濃度を最適化することで、高濃度の組換えヒトフィブロネクチンを抽出することができた
- ・ アガロースベース担体を用いた液体クロマトグラフィーによる高純度かつ安全性が高い組換えヒトフィブロネクチンの精製工程を確立した
- ・ 精製した組換えヒトフィブロネクチンは、インテグリンα5β1への結合能および細胞接着能を有しており、エンドトキシンや細菌・微生物の混入は検出できなかった
- ・ 遺伝子組換えカイコを用いた生産プロセスにより、品質および安全性に優れた組換えヒトフィブロネクチンの供給が可能である

筆頭発表者のCOI開示 演題発表に関連し、開示すべきCOI関係にある企業等はありません。

企業展示ブース(Event Hall) 小間番号[1 6]において、本研究の組換えヒトフィブロネクチンの培養用試薬製品のご紹介を行っております。